

## 상세보기

WIPs Patent Search

상세보기

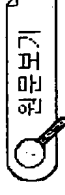


마이폴더저장

마이폴더보기

WIPs Family ( 1 )

INPADOC특허보기



## (54) HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULUS FACTOR POLYPEPTIDE DERIVATIVE

- (19) 국가 (Country) : JP (Japan)
- (11) 공개번호 (Publication Number) : 1990-104598 (1990.04.17)  
▶ [현재진행상태보기](#) ▶ [日本語/한글\(JP\)](#)
- (13) 문헌종류 (Kind of Document) : A (Unexamined Publication)
- (21) 출원번호 (Application Number) : 1989-091678 (1989.04.11)
- (75) 발명자 (Inventor) : MATSUKI SHIGERU, KADOYA TOSHIHIKO, ISHIKAWA MASATOSHI
- (73) 출원인 (Assignee) : KIRIN AMGEN INC.
- (57) 요약 (Abstract) :

NEW MATERIAL: A human granulocyte colony stimulus factor polypeptide deriv. having the 17-th cysteine residue converted into an alanine residue or glycine residue. USE: As a remedy for leucopenia by the radiation curing of cancer and as a leucocyte proliferation agent after bone marrow transplantation. PROCESS: For instance, after a human granulocyte colony stimulus factor (hG-CSF) gene is isolated from a plasmid contg. a gene chemically synthesized corresponding to the amino acid sequence of maturation protein of hG-CSF, a gene having the 17-th amino acid residue converted into Ala is prepd. by the site-specific mutation method by using an oligonucleotide contg. GCT necessary for converting the 17-th Cys codon TGT of the hG-CSF into Ala codon GCT. Thus prepd. gene is integrated into an expression vector to cause transformation of a host (e.g. Escherichia coli) and cultured to give an hG-CSF polypeptide deriv.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO

- (51) 국제특허분류 (IPC) : C07K-013/00 ; A61K-037/02 ; A61K-037/02 ; C12N-015/27 ; C12P-021/02 ; C12P-021/02
- FI :
- (30) 우선권번호 (Priority Number) : JP 1988-089781 (1988.04.12)

Up 1

- 본 특허를 우선권으로 한 특허 : -
- WIPS 패밀리 (WIPS Family 1)
  - ☐ CC ☒ JP ☐ Pat. No. 1990-104598 Pat. Date 1990.04.17 Title -
  - ☐ 패밀리/법적상태 일괄보기
    - ☒ 선택된 패밀리특허 마이폴더 저장
      - ☐ INPADOC ☒ Basic Patent
    - \* 패밀리특허 중 원스에서 보유하고 있지 않은 출원건  
(특허 출원 절차상 공개되지 않았거나, 원스의 특허 데이터 범위에 포함되지 않는 특허)  
JP 1988-089781 (1988.04.12)

[특허포대신청](#) [>> 신청하기](#)



대표전화 : 02-726-1105 | 팩스 : 02-362-1289 | 메일 : [help@wips.co.kr](mailto:help@wips.co.kr)

Copyright©1998-2005 WIPS Co.,Ltd. All rights reserved.

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-104598

⑬ Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)4月17日

C 07 K 13/00

8318-4H※

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全10頁)

⑮ 発明の名称 ヒト顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチド誘導体

⑯ 特 願 平1-91678

⑰ 出 願 平1(1989)4月11日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)4月12日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-89781

㉑ 発 明 者 松 木 滋 群馬県前橋市総社町1丁目2番2号 麒麟麦酒株式会社医薬開発研究所内

㉒ 発 明 者 門 屋 利 彦 群馬県前橋市総社町1丁目2番2号 麒麟麦酒株式会社医薬開発研究所内

㉓ 発 明 者 石 川 雅 敏 群馬県前橋市総社町1丁目2番2号 麒麟麦酒株式会社医薬開発研究所内

㉔ 出 願 人 キリン・アムジェン・アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320、サウザンド・インコーポレーテッド オークス、オーク・テラス・レイン・1900

㉕ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ヒト顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチド  
誘導体

残基又はグリシン残基に変換されていることを特徴とするヒト顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチド誘導体に関するものである。

〔従来の技術〕

## 2. 特許請求の範囲

(1) 17番目のシステイン残基がアラニン残基又はグリシン残基に変換されていることを特徴とするヒト顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチド誘導体。

(2) 大腸菌により発現されることを特徴とする請求項第1記載のポリペプチド誘導体。

(3) ヒト顆粒球コロニー刺激因子ポリペプチド誘導体が大腸菌優先コドンをもつ化学合成DNA分子にコードされていることを特徴とする請求項第2に記載のポリペプチド誘導体。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、17番目のシステイン残基がアラニン

ヒト顆粒球コロニー刺激因子(以下、hG-CSFという。)は多分化能性前駆細胞の増殖および分化を促進する物質として知られ、癌の放射線治療による白血球減少症の治療及び骨髄移植後速やかに白血球を増殖させる目的で使用することができる。

hG-CSFの遺伝子は既にクローニングされており、更に、該遺伝子が動物細胞及び大腸菌内に於いて発現されている(1986年8月22日出願、PCT/US86/01708; 1987年2月27日公開、公開番号W087/01132参照)。

天然及びこの様に発現させたhG-CSFには第17、36、42、64及び74番目にシステイン残基が

あり、そのうち第36及び42番目並びに第64及び74番目のシステイン残基は夫々ジスルフィド結合を形成している。

ところで、大腸菌を利用した生産方法は動物細胞を利用するものに比べて効率的且つ経済的であるが、一方、大腸菌内で産生されたhG-CSFは菌体外に分泌されない為に菌体内に蓄積・凝集してしまう。そこで、これを回収後に、変性剤を用いて該タンパク質を溶解し、ジスルフィド結合を還元剤によって一旦開裂した後に、硫酸銅を用いて再酸化を行ってから、以降の精製操作にかけている。

上記の再酸化に際して、ジスルフィド結合に関与していない17番目のシステイン残基が存在することにより、二量体が一部形成されてしまい、以降の精製操作に於ける収率低下の主な原因となっている。

るように、hG-CSFをコードするDNA分子に対する、該遺伝子の17番目のシステイン残基を含む領域について相補的であるがそのコドン中に塩基変化を有するオリゴヌクレオチドプライマーを使用する部位特異的突然変異法によって得ることができる。

ここで使用するhG-CSFをコードするDNA分子とは、天然hG-CSFの生物学的活性の1以上を有するポリペプチドを発現し得、システイン残基及びそれらのジスルフィド結合に関して天然hG-CSFと同等の構造を有しているものであるならば、いかなるDNA分子をも含有し得る。

即ち、該DNA分子は選択された非哺乳動物宿主による発現に適した優先コドンが組込まれているものであり得る。さらに、該DNA分子はその全てを化学合成によって作製することもできる。

又、大腸菌内で産生されたhG-CSFは溶液中に於いて安定性が低く、pH 7.0、40℃、10日間のインキュベーションによって、その生物学的活性が1/3以下に低下してしまう。

[発明が解決しようとする課題]

本発明は、大腸菌内で産生されたhG-CSFの精製操作に於ける収率を上げ、さらにはhG-CSFの安定性及び活性を向上させ、その結果、hG-CSFの生産性及び有用性を高めることを目的とするものである。

[課題を解決する為の手段]

本発明は、上記課題を解決する為に、17番目のシステイン残基がアラニン残基又はグリシン残基に変換されていることを特徴とするhG-CSF(ポリペプチド)誘導体を提供するものである。

本発明のhG-CSFポリペプチド誘導体をコードするDNA分子は、後述の実施例中で詳述す

また、1以上のアミノ酸残基の同一性及び位置に関して天然hG-CSFと異なるが天然hG-CSFの生物学的活性の1以上を有するポリペプチドを発現し得る、いわゆるhG-CSFポリペプチド類似体をコードするDNA分子も本発明で使用するhG-CSFをコードするDNA分子である。

好ましくは、本発明で使用する、hG-CSFをコードするDNA分子は大腸菌優先コドンを有する化学合成DNA分子である。該化学合成DNA分子の一例を第1図に示す。

本発明のhG-CSFポリペプチド誘導体は当業者に公知の方法に従って、適当なベクター内に挿入されて大腸菌等の原核もしくはチャイニーズハムスター卵巣細胞等の真核宿主細胞内で発現される。宿主細胞としては大腸菌が好ましい。

発現させたhG-CSFポリペプチド誘導体の

精製は当業者に公知の方法でおこなうことができる。

以下、実施例により本発明を詳説する。

#### 実施例 1

##### hG-CSF遺伝子のM13mp19への挿入

hG-CSF遺伝子は、hG-CSFの成熟蛋白質のアミノ酸配列に対応して化学的に合成した遺伝子(第1図)を含むプラスミドpCFH1156hG-CSF(PCT/US86/01708)より単離した。

3  $\mu$ gのpCFH1156hG-CSFを500  $\mu$ lの反応液[10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 50ユニットのXbaI(ベーリンガー・マンハイム社), 50ユニットのEcoRI(宝酒造)中、37℃4時間反応させた。0.8%アガロースを用いた電気泳動を行ない、hG-CSFをコードするDNA鎖を含むDNA断片559塩基対を分離した。このDNA断片を透析チューブに入れ、泳動緩衝

液)のT<sub>4</sub>リガーゼ(ベーリンガー・マンハイム社)、オートクレープ水2  $\mu$ lを加え、15℃にて14時間反応させた。

この反応液を用いて、大腸菌JH 109株(C. Yanish-Perron 他 Gene 33 p103-119 (1985))を既知の方法(D. Hanahan J. Mol. Biol. p557~580 (1980))により形質転換させた。その際プレートには、H寒天培地を用い、また上層寒天としては、H上層寒天を用いた。

12個のプラークより、対数増殖期にあるJH 109株に感染させ、37℃にて5時間培養した。菌体を集め、RF(replicative form) DNAをアルカリ法(T. Maniatis 他、Molecular cloning p368~369 (1982) Cold Spring Harbor)にて分離し、XbaI及びEcoRI制限酵素にて消化し、hG-CSFを含むM13ファージの1クローンをM13S12と命名した。

液中で電気泳動することで溶出した。溶出液にエタノールを加えて沈澱させ、20  $\mu$ lのTE溶液[10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0]にて溶解した。一方、1  $\mu$ gのM13mp19(宝酒造)を30  $\mu$ lの反応液[10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 10ユニットのXbaI(ベーリンガー・マンハイム社)、10ユニットのEcoRI(宝酒造)中、37℃4時間反応させた。0.8%アガロースを用いた電気泳動を行ない、大フラグメントを分離した。ゲル片を透析チューブに入れ、電気泳動緩衝液中で電気泳動することにより溶出した。溶出液にエタノールを加え沈澱させ、20  $\mu$ lのTE溶液にて溶解した。

上記M13mp19大フラグメントを含むTE溶液7  $\mu$ lにhG-CSFをコードするDNA鎖を含むTE溶液5  $\mu$ l、2  $\mu$ lの[500mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM MgCl<sub>2</sub>]溶液、1  $\mu$ lの10mM ATP、3  $\mu$ l(3ユニッ

#### 実施例 2

##### 変異オリゴヌクレオチドの合成と部位特異的突然変異

hG-CSFの17番目のCysコドンTGTをAlaコドンGCTに変異させる為にオリゴヌクレオチド(21塩基長)5' CTGTTCCAGAGCTTTCAGCAG 3'を合成した。合成はホスホアミダイト法(Beaucage 他、Tetrahedron Letters 22 1859~1962 (1981))を用いたDNA自動合成機(アプライドバイオシステムズ社製380A型、H. Hunkapiller 他、Nature 310 105~111 (1984))を用いて行なった。

合成終了後、濃アンモニア水で60℃で5時間処理して、塩基の保護基を除き、かつコントロール・ポアグラスからオリゴヌクレオチドを切出した。こうして得られたオリゴヌクレオチドをSephadex G-25 NAP 10カラム(pharmacia)にかけゲル透過した。この溶出液を8M尿素を含む12%ポリアク

リルアミドを用いた電気泳動にかけた。泳動後蛍光色素を含むTLCプレートをゲルの下に置き、UVランプを用いて、目的のバンドの存在を確認した。目的とするオリゴヌクレオチドを含むゲル片を透析チューブに入れ、該オリゴヌクレオチドをゲルから電気的に溶出した。この透析チューブ内液をSephadex G-25 (pharmacia) のゲル透過カラム (φ 1.5×43cm) にかけて、0.05M トリエチルアミン重炭酸緩衝液 (pH7.5) にて溶出し脱塩した。目的とするオリゴヌクレオチドを含む溶出液を減圧濃縮して純粋なオリゴヌクレオチドを得た。

塩基配列を確認する為のオリゴヌクレオチド (18塩基長) 5'CTCTTCGGATGGCAG3'及びhg-CSFをコードする遺伝子の3'末端のEcoRI制限酵素部位をXhoI制限酵素部位に変異させる為のオリゴヌクレオチド (22塩基長) 5'CGACGGCCCTCGAGTTCTATTA3'も同様に合成し精製した。

(パーリンガー・マンハイム) 1μl (10μg) のT<sub>4</sub> Gene 32 Protein (Pharmacia) を加え37℃にて2時間反応させた。(C.S.Craik 他、Science 228, 291-297 頁、(1985))

反応後、10μlを0.8%アガロースにて電気泳動し、反応が完結した事を確認した。反応液1μlを用いてJH 109株を形質転換した。

36個のプラークより、JH 109培養液に感染後37℃で5時間培養した。遠心分離後菌体を除き、ニトロセルロースフィルターに5μlづつスポットした。このニトロセルロースフィルターを用いて、ドットプロットハイブリダイゼーション (H. J. Zoller & H. Smith Methods in Enzymology, 100 p468~500) を行った。プローブとしては、<sup>32</sup>Pγ-A TPによりラベル化した変異用オリゴヌクレオチドを用いた。ドットプロットハイブリダイゼーションによって陽性となったクローンをM13S

M13S12の1本鎖ファージを培養上清より調製した (H. J. Zollerら、Methods in Enzymology 100 p 468~500)。上記のように合成したCysよりAlaに変異させるオリゴヌクレオチド1μgを10μlのリン酸化反応液 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 10mM HgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 10mM ATP, 15ユニットのT<sub>4</sub> ポリヌクレオチドキナーゼ (パーリンガー・マンハイム) ) 中で37℃1時間反応させ5'末端をリン酸化した。

この反応液4μlをM13S121本鎖ファージ1μgを含むTE溶液4μlに加え、更にT<sub>4</sub> ポリメラーゼ緩衝液 [330mM Tris-HCl, pH7.4, 660mM KCl, 50mM DTT, 100mM HgCl<sub>2</sub>] 2μl、及びオートクレープ水1μlを加えた。100℃にて5分間処理後、37℃にて5分インキュベート後氷水に入れた。この溶液に4μl (16ユニット) のT<sub>4</sub> ポリメラーゼ (宝酒造)、1μl (1ユニット) のT<sub>4</sub> リガーゼ

1221と命名した。

hg-CSF遺伝子の3'末端のEcoRI制限酵素部位をXhoI制限酵素部位に変換した。M13S1221の一本鎖ファージに対して、EcoRIよりXhoIへの変換用オリゴヌクレオチドを用いて、部位特異的突然変異を同様に行なった。36個のプラークよりJH 109株に感染させ、RFを得た。EcoRIによって切断されず、XhoIによって切断されるクローンM13S12211を得た。反応は0.3μgのRFを10μlの反応液 [50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM HgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 100mM NaCl, 10ユニットのEcoRI又はXhoI (いずれも宝酒造)] にて37℃2時間行なった。

M13S12211の1本鎖ファージについて、塩基配列確認用プライマーを用いてジデオキシ法 (J. Messing Methods in Enzymology, 101 p20~78, 1983) により塩基配列を読み、17番目のCys (T

G T) が Ala (G C T) に変換されていることを確認した(以下、「ala 17 hG-CSF 遺伝子」という。)

### 実施例 3

#### ala 17 hG-CSF 発現ベクターの構築

3  $\mu$ g の M13S12211 の RF を 500  $\mu$ l の反応液 [10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM HgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 50ユニットの XbaI (ベーリンガー・マンハイム社)] 中 37℃ 4 時間反応させた。更に 5  $\mu$ l の 5M NaCl, 及び 5  $\mu$ l (50ユニット) の XhoI (宝酒造) を加え 37℃ 3 時間反応させた。17番目のアミノ酸残基を Cys より Ala に変換した ala 17 hG-CSF 遺伝子を含む小フラグメントを得た。

1  $\mu$ g の pCFH 536 (米国特許第 4,710,473号, ATCC No.39934) を 100  $\mu$ l の反応液 [10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM HgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl,

株を pSA2116/AM7 とした。

### 実施例 4

#### hG-CSF 誘導体の製造法

前記の pSA2116/AM7 をアンピシリン及びカナマイシンを含む L 培地にて 28℃ で一晩振盪培養した。この培養液 25  $\mu$ l を 500  $\mu$ l の L 培地に加え、28℃ で 4 時間振盪培養した。予め 60℃ にしておいた L 培地 500  $\mu$ l を培養液に加え、42℃ にして更に 3 時間振盪培養した。得られた大腸菌の一部をサンプル緩衝液で煮沸 (5 分) し、煮沸液について SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、ala 17 hG-CSF の含有量を調べた。この条件において ala 17 hG-CSF は、大腸菌細胞蛋白質の約 30% であった。

更に、培養液を遠心分離して約 20g の菌体を得た。140  $\mu$ l の蒸留水を加え懸濁した後、最終濃度 1mM になる様に 1M DTT を加えた。この間溶液は

30ユニットの XbaI (ベーリンガー・マンハイム社)] 中 37℃ 4 時間反応させた。更に 1  $\mu$ l の 5M NaCl 及び 3  $\mu$ l (30ユニット) の XhoI (宝酒造) を加え 37℃ で 3 時間反応させた。0.8% アガロース電気泳動にて大フラグメントを得た。

ala 17 hG-CSF 遺伝子を含む TE 溶液 5  $\mu$ l に pCFH536 大フラグメントを含む TE 溶液 7  $\mu$ l, 2  $\mu$ l の [500mM Tris-HCl, pH7.4, 100mM HgCl<sub>2</sub>] 溶液、1  $\mu$ l の 10mM ATP, 3  $\mu$ l (3ユニット) T<sub>4</sub> リガーゼ (ベーリンガー・マンハイム)、2  $\mu$ l のオートクレープ水を加えて 15℃ にて 14 時間反応させた。

この反応液を用いて、 $\lambda$ CI857 を含むプラスミド pMW 1 (ATCC No.39933) を有する大腸菌 AM7 を形質転換した。アンピシリン及びカナマイシン耐性のコロニーより、プラスミドを単離し、XbaI 及び XhoI にて切断して ala 17 hG-CSF 遺伝子が挿入されている事を確認した。得られた菌

4℃ に保持した。フレンチプレスを用いて菌体を破碎し、沈澱を集めた。この沈澱を 1% デオキシコール酸、5mM EDTA, 5mM DTT を含む 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.2) 140  $\mu$ l にて再懸濁した後、遠心分離し沈澱を集めた。更に蒸留水にて沈澱を洗浄した後、1% ドデシル-N-サルコシナトリウムを含む 20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.2) を用い沈澱を可溶化した。更に硫酸銅を約 0.001% になる様に加えた後、1 晩室温にて攪拌した。この水溶液に 100  $\mu$ l の蒸留水と 200  $\mu$ l の 20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.7) 及び 100g の Dowex 1  $\times$  4 樹脂を加え、約 1 時間攪拌した後、戸過し、Dowex 1  $\times$  4 樹脂を除いた。この水溶液を予め 20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.7) にて平衡化した DEAE-セルロース (ワットマン社 DE52) カラム (φ 2.6  $\times$  3.2 cm) に添加した。20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.7) にて充分洗浄した後、次いで 35mM 塩化ナ

トリウムを含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.7)にてala 17 hG-CSFを含む蛋白質を溶出した。この溶液に50%酢酸を加えてpHを5.4にした。更にこの溶液に最終濃度を10mMになる様に1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.4)を加えた。予め20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.4)にて平衡化したCM-セファロース(ファルマシア社 Fast-flow)カラム(φ 2.6×2.8 cm)にこの溶液を添加した。20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.4)にて充分洗浄した後、37.5mM塩化ナトリウムを含む20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.4)を用いてala 17 hG-CSFを溶出することにより精製した。10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)に対して透析を一晚4℃にて行ない、透析内液を集めて濃度を0.5mg/mlになる様に10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)にて調整した。

更に、実施例2と同様な方法を用いて、hG-CSF

煮沸し、煮沸液についてSDS-ポリアクリルアミドゲル(15%)電気泳動を行なった。電気泳動後ゲルをCBB(クーマジー・ブリリアント・ブルー)染色した後、画像処理電気泳動解析システム(イムノメディカ社)を用いて蛋白質バンドの定量を行ない、hG-CSFの単量体と二量体の量を比較した。その結果、精製過程における二量体/単量体の比が、ala 17 hG-CSFでは0.033と低く抑えられているのに対し、17番目がCys残基のままのhG-CSFではその比が0.169にも達していることが判明した。

#### 実施例 6

#### hG-CSF誘導体のN末端アミノ酸配列及びアミノ酸分析

実施例4で得た各hG-CSF誘導体を用いて気相タンパク質シーケンサー(Applied Biosystems社、470A型)によって、N末端アミノ酸配列を気相タ

の17番目のシステインコドンでグリシン、イソロイシン、チロシン、アルギニンに相当するコドンに置きかえるか、又は、システインコドンを欠失させたオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドを用いて、実施例3及び上述の方法と同様な方法を用いて、hG-CSFの17番目のアミノ酸残基がそれぞれグリシン、イソロイシン、チロシン、アルギニン残基に置きかわるか、又は17番目のアミノ酸残基が欠失したhG-CSF誘導体を得た。以下これらの誘導体をそれぞれgly 17 hG-CSF, ile 17 hG-CSF, tyr 17 hG-CSF, arg 17 hG-CSF及びdel 17 hG-CSFと称す。

#### 実施例 5

#### ala 17 hG-CSFの二量体形成割合

上記したala 17 hG-CSFを製造する際、Dowex 1×4樹脂にて処理した水溶液の1部をとり、メルカプトエタノールを除いたサンプル緩衝液中で

ンパク質シーケンサー(Applied Biosystems社、470A型)および逆相高圧液体クロマトグラフィー(Spectra Physics社8100型、使用カラム:センシュバック SEQ-4カラム、4.6×300 mm)によって同定した。

その結果以下の様に塩基配列から予測されるアミノ酸配列(一文字表記)と一致した。

hG-CSF	HTPLGPASSLPQSFLKCLEQ
ala 17 hG-CSF	HTPLGPASSLPQSFLKALEQ
gly 17 hG-CSF	HTPLGPASSLPQSFLKGLEQ
ile 17 hG-CSF	HTPLGPASSLPQSFLKILEQ
tyr 17 hG-CSF	HTPLGPASSLPQSFLKYLEQ
arg 17 hG-CSF	HTPLGPASSLPQSFLKRLAQ
del 17 hG-CSF	HTPLGPASSLPQSFLK LEQ

またヨウドアセトアミドを用いてカルボキシメチル化した各hG-CSF誘導体を6N HCl 200μl中において110℃で24時間加水分解を行なった後、アミ



ノ酸分析装置（日立 835型；カスタム#2617イオン交換樹脂）にかけアミノ酸分析を行なった。

#### 実施例 7

##### hG-CSF誘導体の活性

hG-CSF活性はRalph P.等の方法（Blood, 68巻、633-639頁、1986年）、およびMoore R. N.等の方法（J. Immunology, 131巻、2374-2378頁、1983年）に準じて、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量を指標とする方法により求めた。すなわち、Balb/c（メス）マウスの骨髓細胞浮遊液  $0.1\text{ml}$ （ $4 \sim 8 \times 10^4$  有核細胞）、および10%牛胎児血清を含むMcCoy's 5A培養液（GIBCO社製）で適当に希釈した hG-CSF 標準品、又はhG-CSF誘導体試料  $0.1\text{ml}$ を混合し、96穴平底マイクロプレート（Becton Dickinson社製）に入れて  $37^\circ\text{C}$  5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件下で3日間培養した。次いで、 $1\mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加

し、上記条件下でさらに5時間培養を行なった。その後、細胞をガラス繊維フィルター（ワットマン社製）上に移し、液体シンチレーター（NEN Research Products社製）を加え、細胞に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。被検試料のhG-CSF活性は、あらかじめコロニーアッセイ法（軟寒天法）で力価を定めた標準品との比較による平行線検定法（中村悦郎、木村都共著、生物検定法と応用推計学、廣川書店、昭和61年、第3版）により求めた。

尚、上記のマウス骨髓細胞浮遊液はMcCoy's 5A complete 培養液を用いて調製した。

[McCoy's 5A complete 培養液]

McCoy's 5A培地（Modified）粉末  $2.4\text{g}$ に炭酸水素ナトリウム  $0.44\text{g}$ 、HEM アミノ酸溶液（50x） $1.6\text{ml}$ 、HEM ビルビン酸ナトリウム（100mM） $2\text{ml}$ 、

HEM ノンエッセンシャルアミノ酸溶液（10mM）（100x） $0.8\text{ml}$ 、炭酸水素ナトリウム溶液（7.5%） $1.2\text{ml}$ 、HEM ビタミン溶液（100x） $0.8\text{ml}$ 、L-グルタミン（200mM）（100x） $1.2\text{ml}$ 、L-セリン（ $0.21\text{g}/50\text{ml}$ ） $0.4\text{ml}$ 、L-アスパラギン（ $0.4\text{g}/50\text{ml}$ ） $0.4\text{ml}$ 、Gentamicin（ $50\text{mg}/\text{ml}$ ） $0.2\text{ml}$ を加え、総量を  $200\text{ml}$ としてミリポアフィルターで戸過滅菌を行なった。尚、L-セリン、L-アスパラギン、炭酸水素ナトリウム、およびGentamicinはシグマ社製、これ以外はGIBCO社製を使用した。

その結果を下記に示す。ala 17 hG-CSF 及び gly 17 hG-CSF 誘導体は17位にCysが存在するhG-CSFと比較して、同等もしくはそれ以上の活性を有していることが示された。

サンプル名	生物学的活性 U/mg
hG-CSF	$1.4 \times 10^8$
ala 17 hG-CSF	$2.1 \times 10^8$
gly 17 hG-CSF	$1.9 \times 10^8$
ile 17 hG-CSF	$1.2 \times 10^8$
tyr 17 hG-CSF	$7.6 \times 10^7$
arg 17 hG-CSF	$4.8 \times 10^7$
del 17 hG-CSF	$1.4 \times 10^7$

#### 実施例 8

##### ala 17 hG-CSF の安定性

精製したala 17 hG-CSF 約  $450\mu\text{g}$ を  $1\text{ml}$ の20mM クエン酸ナトリウム緩衝液（pH7、100mM塩化ナトリウム）に溶解し、 $40^\circ\text{C}$ で10日間加温した後、実施例7の方法で活性を測定した。その結果、下記のように、ala 17 hG-CSF はhG-CSFよりも安定であることが判明した。

サンプル名	10日間加温後の 活性残存率 (%)	10日間加温後の活性 U/mg
hG-CSF	27.1	$3.8 \times 10^7$
ala 17 hG-CSF	90.5	$1.9 \times 10^8$

さらに、40℃で10日間加温後のサンプル各20μgをSDS-ポリアクリルアミド(12.5%)ゲル電気泳動により分析した。還元条件下でサンプルを分析する場合は、80mMジチオスレイトール、5% SDS、10% グリセロールを含む0.25Mトリス-塩酸緩衝液(pH 6.8)中で、65℃で10日間加熱処理後、サンプルをゲルへ注入した。非還元条件下で分析する場合は、5% SDS、10% グリセロールのみを含む0.25Mトリス-塩酸緩衝液(pH 6.8)とサンプルを混合後、直ちにサンプルをゲルへ注入した。泳動後のゲルは1.25%クマシーブリリアントブルーR-250(半井化学)を含む40%メタノール、10%酢酸混液で染色した。

ール、10%酢酸混液で染色した。

染色後のゲルを、島津クロマトスキャナーCS-930型を用いて波長530nmでスキャンニングし、未変性物(モノマー)に相当するバンドのピーク面積を求めた。精製ala 17 hG-CSFを還元処理したもののには、オリゴマーを全く認めなかったもので、このピーク面積の平均を100%として、非還元条件下の各サンプル中のモノマーの割合(%)を算出したところ、以下の様な結果を得た。

サンプル名	モノマーに相当するピーク の面積の割合 (%)
hG-CSF	24.2
ala 17 hG-CSF	97.0

この結果より、ala 17 hG-CSFは、熱に対して安定であることが示された。

#### [効果]

以上の記載から明らかなように、本発明のhG-

CFS誘導体は、17番目のシステイン残基をアラニン残基又はグリシン残基に変換することにより、hG-CSF分子内でジスフィルド結合に関与しないシステイン残基を除去したものである。この結果、遊離システイン残基による二量体の形成が著しく減少し、hG-CSFに較べて本発明のhG-CSF誘導体の精製効率、安定性及び活性が大幅に上昇するという効果を奏効し得たものである。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明で用いるhG-CSFをコードするDNA分子の一例を示す。

第2図はpSA 2116の作成工程を示す。

出願人 特許・アムジェン・インコーポレーテッド  
代理人 弁理士 川 口 義 雄  
代理人 弁理士 中 村 至  
代理人 弁理士 船 山 武

第 1 回

CTAGAAAAACCAAGGAGGTAATAAATA

10 20 30 40 50 60  
ATGACTCCATTAGGTCTGCTTCTTCTGCGCAAAGCTTCTGCTGAAATGTCTGGAA  
MetThrProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysCysLeuGlu

70 80 90 100 110 120  
CAGGTTCTGTAATCCAGGGTGACGGTGCTGCACTGCAAGAAAACTGTGCGCTACTTAC  
GlnValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyr

130 140 150 160 170 180  
AAACTGTCCATCCGGAAGAGCTGGTACTGCTGGGTCACTTCTTTGGGATCCCGTGGGCT  
LysLeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAla

190 200 210 220 230 240  
CCGCTGTCTTCTGTCCATCTCAAGCTCTTCAGCTGGCTGGTTGCTGTCTCAACTGCAT  
ProLeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHis

250 260 270 280 290 300  
TCTGGTCTGTTCTGTATCAGGGTCTTCTGCAAGCTCTGGAAGGTATCTCTCCGGAAGCTG  
SerGlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeu

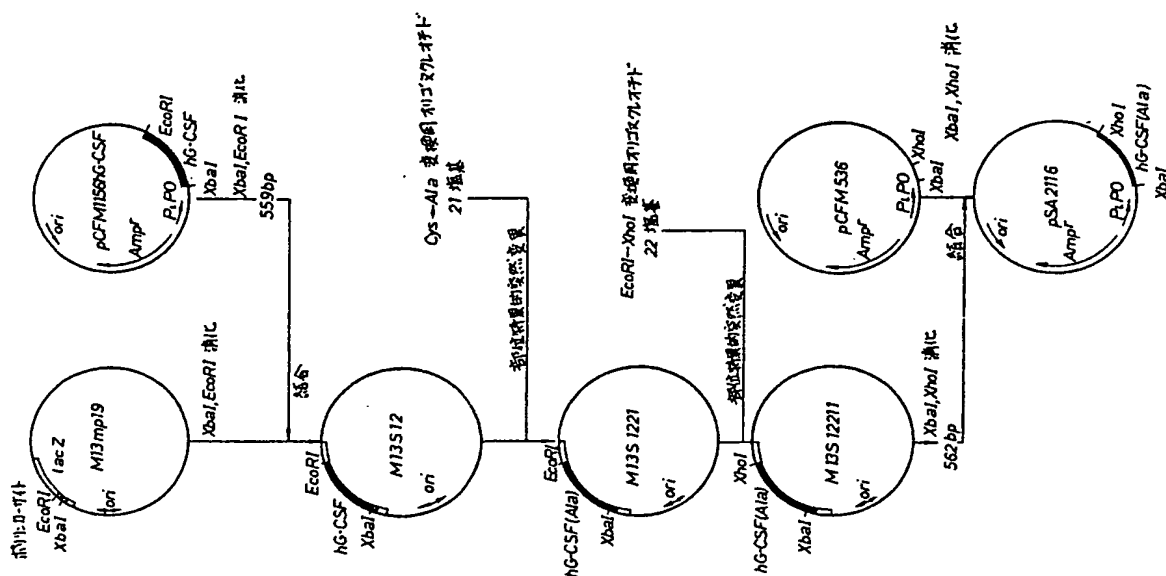
310 320 330 340 350 360  
GGTCCGACTCTGGACACTCTGCAGCTAGATGTAGCTGACTTTGCTACTACTATTTGGCAA  
GlyProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGln

370 380 390 400 410 420  
CAGATGGAAGAGCTCGGTATGGCACCAGCTCTGCAACCGACTCAAGGTGCTATGCCGGCA  
GlnMetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAla

430 440 450 460 470 480  
TTCGCTTCTGCATTCCAGCGTCGTGCAGGAGGTGTAAGTTGCTTCTCATCTGCAATCT  
PheAlaSerAlaPheGlnArgArgAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSer

490 500 510 520 530  
TTCCTGGAAGTATCTTACCGTGTCTGCGTCATCTGGCTCAGCCGTAATAGAATT  
PheLeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro\*\*\*\*\*

第 2 回



第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>

// A 61 K 37/02

C 12 N 15/27  
C 12 P 21/02  
(C 12 P 21/02  
C 12 R 1:19)

識別記号

ABB  
ABY  
AGA

庁内整理番号

8615-4C

ZNA H 8214-4B